

AUTORES

AUTHORS

✉ **Elisabeth Borges GONÇALVES**

EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos
Av. Das Américas, 29.501, Guaratiba
CEP 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil
e-mail: goncaleb@ctaa.embrapa.br

Tânia Barreto Simões CORRÊA

EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos
tania@ctaa.embrapa.br

Eduardo Delgado ASSAD

EMBRAPA - Informática Agropecuária
assad@cpia.embrapa.br

Hilda da Rosa RODRIGUES

EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos
hilda@ctaa.embrapa.br

Edson Eyji SANO

EMBRAPA - Cerrados
sano@cpac.embrapa.br

Sílvia Aida Rodrigues da CUNHA

EMBRAPA - Cerrados
silvia@cpac.embrapa.br

Maria de Lourdes Mendes SOUZA

EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos
mlourdes@ctaa.embrapa.br

José Ricardo Hassel LOPES

Fundação Bio-Rio
equifarma-carmo@biorio.org.br

PALAVRAS-CHAVE

KEY WORDS

Café; Validação Intralaboratorial; Validação de Métodos Analíticos; Qualidade Para Laboratórios de Análises.

Coffee, Single Laboratory Validation, Validation of Methods, Quality for Analytical Laboratories.

✉ Autor Correspondente

✉ Corresponding Author

RESUMO

A adição de impurezas em café torrado e moído tem se revelado um negócio rendoso para quem o pratica, um custo financeiro razoável para o consumidor e alto para a sociedade; assim, controlar laboratorialmente esta adição é crucial. Nos métodos tradicional e por imagem, o preparo da unidade de exame é o mesmo, mas no método tradicional, a quantificação de impurezas demanda tempo muito maior e muito grande. Para se adotar o método de imagem é necessário validá-lo, em especial para cascas e paus. Então este método foi validado do ponto de vista dos diversos requisitos de validação em normas e guias. Ele se revelou seletivo para cascas e paus frente às concentrações de soja estudadas, por exemplo; seus limites de detecção e quantificação foram 0,03 e 0,05% respectivamente; a linearidade da medição foi significativa e sem evidência de falta de ajuste; a faixa de trabalho foi de 0,05 a 4%. Não foram verificados vícios significativos ao longo da medição; variações intralaboratoriais foram estabelecidas, e os resultados de medição poderão ser escritos $\bar{X} \pm 0,14$, para \bar{X} = média de duplicatas, até nova avaliação. Adicionalmente, para cascas e paus na presença de soja, não foi evidenciado falso positivo ou negativo. Nos requisitos apresentados, o método foi considerado válido, mas do ponto de vista métrico e de interesse legal, sugeriu-se refinamento da precisão no intervalo 0,20 a 2,2%, e nessa oportunidade testar o limite de detecção 0,03% e de quantificação 0,05%.

SUMMARY

The addition of impurities to roasted and ground coffee has been shown to be economically advantageous to those who carry out such practices, with considerable costs for the consumer and society, and thus its control is crucial. Preparation of the material for examination is the same for both the traditional and image methods, but quantification of the impurities demands much more time for the traditional method. However, in order to adopt the alternative digital image method, it must be validated, especially for husks and straws. Thus this method was validated from the point of view of the various validation requirements found in the norms and guidelines. The image method was found to be selective for husks and straws at the soybean concentrations studied, for example; the detection and quantification limits being 0.03 and 0.05% respectively. The linear model fitted the data well and significantly, and there was no evidence of lack of fit. The working range spanned from 0.05 to 4.00%. No significant bias was detected throughout the measurements. Intra-laboratory variations were established, and the results of the measurements could be written as $\bar{X} \pm 0,14$, for \bar{X} = the mean of the duplicates up to a new evaluation. In addition, for husks and straws in the presence of soybeans, no false positive/negative results were obtained. The method was considered valid for the requirements presented, but from the metric point of view and considering the legal interests, refinement of its precision within the range from 0.2 to 2.2% is suggested, testing the limit of detection and the limit of quantification at 0.03 and 0.05%, respectively.

1. INTRODUÇÃO

Cascas e paus são naturais no café, no entanto, em concentrações acima do limite legal (1%), são considerados impureza. Esta impureza, além de milho, soja, açúcar e outros materiais, tem sido usada com o fim de fraudar café torrado e moído, o que, sem dúvida, tem se mostrado um bom negócio para seus praticantes.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do MINISTÉRIO DA SAÚDE, através de sua Portaria 377 da ANVISA (1999), nas características microscópicas do café torrado e moído admite cascas e paus como impureza e estabelece um teor máximo de 1%.

O processo de medição de impurezas por extrato aquoso, tradicionalmente usado, consiste de preparação de lâminas microscópicas, reconhecimento e contagem visuais. Como alternativa, o método de imagem tem a mesma preparação de amostra, o reconhecimento também é visual, porém a quantificação é feita por análise de imagem, baseada no comportamento espectral do pó de café. Assim, o método alternativo é muito mais rápido que o anterior.

No desenvolvimento do método de imagem para cascas e paus, café puro foi adicionado de diversas impurezas que o método pode detectar, nos níveis de: 1, 2, 3, 4, 5, 20, 30, 40 e 50%, conforme (SANO et al., 2000; ASSAD et al., 2002; SANO et al., 2003). Admitiu-se relação exponencial entre áreas ocupadas pelas impurezas nas imagens RGB e concentrações de cascas e paus. Assim, foram obtidas regressões log-lineares, que são a base do processo de quantificação. Similar foi realizado por estes autores para soja, milho, açúcar e outros.

Porém, desenvolver método sem a correspondente validação formal, documentada de forma aceita pela comunidade nacional e internacional, hoje não é suficiente.

A validação de métodos vem sendo extensamente discutida e culminou com o JOINT FAO/IAEA EXPERT CONSULTATION (1998), na forma do FAO Food And Nutrition Paper 68. Hoje, em função de sistemas de qualidade para laboratórios como na NBR / ISO / IEC 17025: 2001, já há consenso sobre os principais requisitos de validação de métodos.

Segundo essa norma, validação é confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Entre os requisitos de validação pode-se mencionar: vício (*bias*); incerteza; limites de detecção e quantificação; seletividade; linearidade; repetitividade; reprodutibilidade; faixa de trabalho; robustez e outros (NATA TN 17: 1998; EURACHEM, 1998).

Então, o objetivo deste artigo foi validar ou verificar o método de detecção e quantificação de impurezas por imagem para cascas e paus em pó de café, em função de diversos requisitos de validação. Similar foi realizado para milho, soja e açúcar, porém, por questões de espaço, apresenta-se somente a validação para cascas e paus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais básicos

Os principais materiais foram amostras de pó de café puro e outras de café artificialmente contaminadas com cascas e paus, métodos por análise de imagem e por microscopia (extrato aquoso), correspondentes equipamentos para determinação de impurezas e programas estatísticos. Diversas impurezas foram estudadas, porém

este artigo preferiu, por problemas de espaço, concentrar-se em publicar a parte referente a cascas e paus, até porque é a controlada por legislação.

2.2 Requisitos de validação considerados

Dos requisitos apresentados em BIPM/IEC/IFCC/ISO/IUPAC/OIML (1993), ISO 3534-3: 1993, Eurachem (1998), NATA TN 17: 1998 e DOQ-CGRE-008: 2003, foram avaliados apenas os considerados adequados ao método de imagem, conforme:

Seletividade: determinar acuradamente e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz.

Precisão: concordância entre resultados de ensaios independentes. Expressa por incerteza de medição, ou similar.

“Exatidão” (*trueness, veracidade*): concordância entre um valor médio obtido de um largo conjunto de resultados de ensaio e um valor referência aceito. Comumente expressa em vício.

Vício: componente sistemático do erro de um instrumento ou ensaio. Diferença entre valores esperados dos resultados de testes e um valor referência aceito.

Linearidade: habilidade de fornecer resultados proporcionais à concentração do analito.

Faixa (intervalo) de trabalho: Faixa de concentração na qual podem ser alcançadas exatidão e precisão aceitáveis.

Limite de detecção: menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não quantificada, sob condições de ensaio.

Limite de quantificação: menor concentração que pode ser determinada com precisão aceitável e acurácia sob as condições de ensaio.

Falsos positivos ou negativos e adequação ao uso foram também estudados como requisitos adicionais.

2.3 Experimentos planejados

A quantidade de repetições seguiu as recomendações de Nata TN 17: 1998 e Eurachem (1998). Assim, foram empregadas, em geral, 10 unidades/concentração adicionada de cascas e paus para café adicionado nas proporções de: 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; e 5%.

Misturas de café com cascas e paus e soja conforme: café com 1% de cascas e paus mais 5% de soja; café com 1% de cascas e paus mais 10% de soja; café com 5% de cascas e paus mais 5% de soja; e café com 5% de cascas e paus mais 10% de soja, foram preparadas e analisadas para verificar seletividade.

Os experimentos foram cegos, aleatorizados de acordo com a distribuição amostral correspondente e obtidos com o uso de programas de estatística em 2.6. As unidades amostrais foram codificadas com numeração de 3 dígitos aleatórios para evitar sugestionamento.

Os delineamentos foram experimentos inteiramente aleatorizados e blocos aleatorizados segundo indicações disponíveis (EURACHEM, 1998; NATA TN 17, 1998; e KEMPTHORNE, 1979).

Uma vez que o método foi verificado para diversas impurezas e aqui somente uma foi apresentada, deve-se mencionar que a quantidade de amostras nesta publicação abrange todas as

impurezas pesquisadas, por isto, o número de amostras poderá parecer, equivocadamente, muito grande ao leitor.

2.4 Regressão com falta de ajuste

Embora o método de imagem tenha funções lineares no seu desenvolvimento, é preciso mostrar que ele responde como pretendido. Então, regressões lineares foram empregadas e incluíram falta de ajuste, como recomendado por (THOMPSON et al., 2002). Regressões lineares, em geral, podem ser encontradas em textos clássicos (DRAPER e SMITH, 1981).

2.5 Comparação de precisão entre os métodos

Infelizmente, registros disponíveis do método tradicional, extrato aquoso, não incluem concentrações <1% de impurezas. Empregou-se, então, medições de cascas e paus nas concentrações 1 a 2 e 2 a 3%, feitas pela Fundação BIO-RIO, feitas conforme este método em amostras de material comercial, fornecidas pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC).

Dados nessa faixa de medição foram comparados aos obtidos na presente validação, realizando, assim, uma primeira comparação dos 2 métodos.

2.6 Softwares e outros detalhes

Os softwares estatísticos usados foram SAS, SAS (1985) e Statgraphics (MANUGISTICS, 1993).

Outros métodos de análise de resultados, além dos apresentados nos itens 2.3 e 2.4, foram cálculo de estatísticas básicas, construção de intervalos de confiança Snedecor e Cochran (1980), estatística de Bartlett, Hollander e Wolfe (1973), cálculo de precisões, Scheffé (1973) e estatísticas F (SNEDECOR, 1969; KEMPTHORNE, 1979). O nível máximo de significância admitido foi de aproximadamente 10%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seletividade

Pôde-se observar que os desvios das medições de cascas e paus não tiveram seus comportamentos (seus resultados) significativamente alterados com a presença de soja, $F = 2,13$ como mostrado na Tabela 1. Portanto o método é seletivo para cascas e paus, ou seja, não mede como cascas e paus algo que é soja.

TABELA 1. Comportamento das medições de cascas e paus em amostras com soja como interferente.

Causas variação	Graus liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F
Soja	1	0,20667384	0,20667384	2,13 ns
Erro	244	23,63011966	0,09684475	-
Total	245	23,83679350	-	-

F: F de Snedecor; ns: não significativo; e $p = 0,05$.

3.2 Resposta a variações do estímulo e precisão inicial

Variando-se a concentração adicionada de cascas e paus nas amostras contaminadas, as medições demonstraram responder

significativamente às variações no teor de cascas e paus nas amostras ao nível de 5%, $F = 132,50$, como consta na Tabela 2.

No entanto, a medição da concentração adicionada de cascas e paus mostrada na Tabela 2 teve como precisão inicial a variação $s^2 = 0,46$, o que implicou num coeficiente de variação de modelagem de 20,19%, mais alto que o desejável para diversas medições em alimentos. Este valor será revisado no decorrer deste artigo.

TABELA 2. Resultados do ajuste do delineamento inicial.

Causas variação	Graus liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F
Cascas e paus	9	251,07	27,90	132,50 ^a
Erro	108	22,74	0,21	-
Total	117	273,81	-	-

^a: significativo; $p < 0,01$; e F: F Snedecor.

3.3 Vício

Foram realizados testes de vício (*bias*) na detecção e quantificação de cascas e paus. O vício médio detectado foi 0,00%, o que não revelou nenhuma evidência de vício (erro sistemático) significativo, T-Student = 0,06, $p < 0,01$, nas concentrações estudadas.

3.4 Linearidade

Uma vez que foi obtido o valor $F = 37284,96$ como indicado na Tabela 3, significativo a nível <0,01, houve linearidade significativa do resultado da medição de cascas e paus em função de sua concentração no material.

O intercepto, neste caso, não foi significativo, $T = 1,33$, então pôde ser considerado nulo, resultando numa reta que passa pela origem. Portanto, quando não há cascas e paus o método assim indica, e o valor zero de medição está refletido corretamente na concentração de cascas e paus das amostras.

Adicionalmente, embora o valor do coeficiente de regressão tenha apresentado diferença significativa quando comparado estatisticamente com o valor 1 ($T = 193,09$), esta diferença foi considerada pequena (1-0,99).

A regressão linear pôde ser escrita como:

Medição de cascas e paus pelo método de imagem = $0,011000 + 0,986678 \times$ concentração de cascas e paus na amostra.

A falta de ajuste não foi significativa. Assim, a variação encontrada nos pontos de concentração adicionada estabelecidos foi equivalente à casual, ou seja, não houve imprecisão devida a erros não controlados. O comportamento global da regressão linear foi bastante positivo, e forneceu coeficiente de correlação de 99,75%, superior ao valor mínimo propagado pela bibliografia em validação.

O exame da Figura 1a, dos valores observados e regressão ajustada, confirmou a linearidade da medição em termos da concentração de cascas e paus adicionada na amostra.

A Figura 1b é clara quanto à variação na regressão, podendo-se notar certa manutenção da variação à medida que se aumenta o teor de cascas e paus na faixa estudada. Não foram observados valores excêntricos no ajuste.

TABELA 3. Resultados do ajuste de regressão linear para medição de cascas e paus.

Causas variação	Graus liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F
Regressão	1	320,03	320,03	37284,96 ^a
Falta de ajuste	8	0,09	0,01	1,36
Erro puro	178	1,50	0,008	
(Resíduos)	(186)	(1,60)	(0,009)	
Total	187	321,63		
Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	T	
Intercepto	0,01	0,008	1,33	
Coefficiente	0,99	0,01	193,09 ^a	

^a: significativo; p < 0,01; T: T-Student; e F: F de Snedecor.

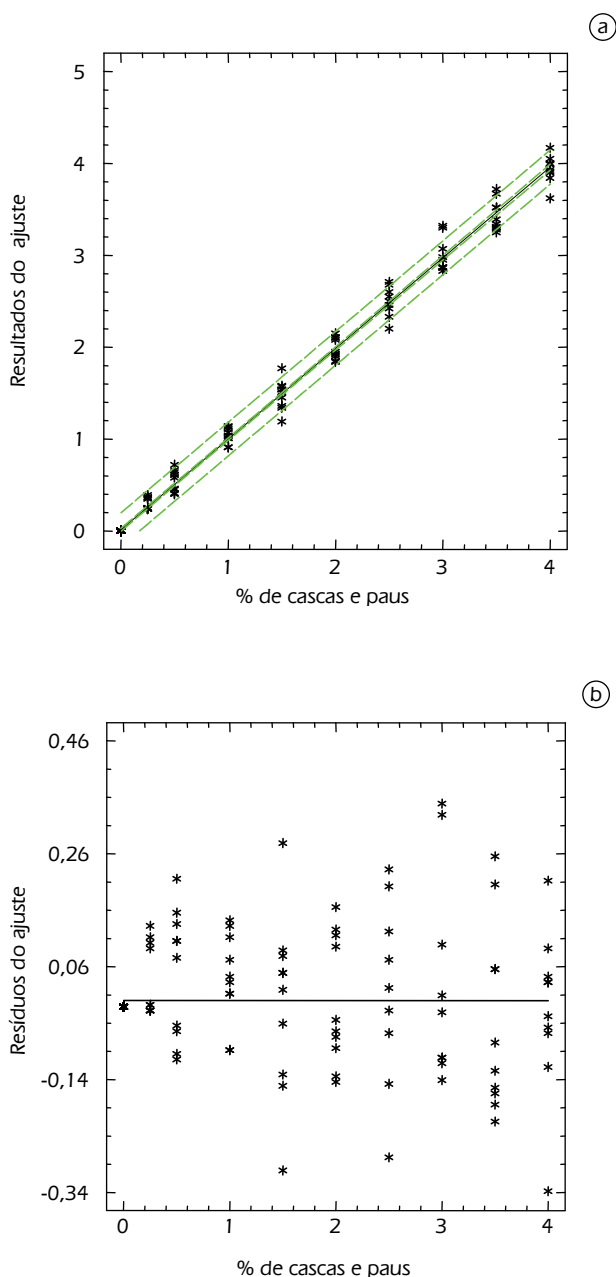


FIGURA 1. Regressão ajustada (a) e resíduos do ajuste (b) segundo concentrações de cascas e paus adicionadas.

3.5 Limites de detecção e quantificação

Valores de medição nulos foram obtidos para café puro, assim, a variação experimental foi nula. Então se empregou o valor 0,01, teórico, correspondente a uma possível variação em um sistema com duas casas decimais como desvio padrão. Em função disto o limite de detecção e o limite de quantificação foram 0,03 e 0,05% respectivamente.

3.6 Faixa de trabalho e variação intralaboratorial

Apesar do observado na Figura 1b em 3-4, um teste de variação dentro da faixa estudada para cascas e paus demonstrou diferenças significativas de variação através das concentrações, uma vez que χ^2 Bartlett = 182,70 foi significativo, ou seja, houve variações significativas nas precisões no decorrer da escala, então testes adicionais foram realizados para determinar a faixa de trabalho.

Na Tabela 4 foi notada região de perda acentuada de precisão, por exemplo entre concentrações 2 e 2,5 e entre 4 e 5%, facilmente visualizadas na Figura 2. Uma das maiores perdas de precisão, ao ser testada, revelou-se significativa ($F^{2 \times 2,5} = 41,82$, significativo para p = 0,05). Porém, não se encontrou um padrão definido na faixa estudada.

TABELA 4. Estatísticas básicas no método por imagem segundo concentrações de cascas e paus adicionados.

Adição [%]	Amostras	Média	Desvio padrão
0,00	128	0,00000	0,00000
0,25	10	0,29300	0,06499
0,50	10	0,55400	0,11413
1,00	23	1,04913	0,10804
1,50	10	1,48500	0,15953
2,00	10	1,98300	0,11547
2,50	10	2,61800	0,42026
3,00	10	2,92300	0,31546
3,50	10	3,43000	0,16793
4,00	10	3,94000	0,14476
5,00	15	4,77933	1,16649

Então, a faixa de trabalho para cascas e paus ficou compreendida entre seu limite de quantificação 0,05, e 4,00%, pelas concentrações aqui estudadas.

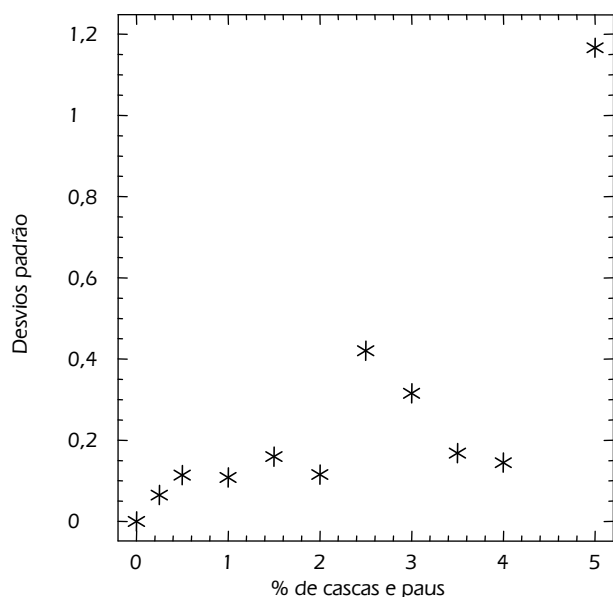


FIGURA 2. Desvios padrão segundo concentrações de cascas e paus adicionados.

3.7 Variação intralaboratorial e incerteza

Verificando-se a Figura 3, houve possibilidade de valores aberrantes (*outliers*) na última concentração adicionada de cascas e paus, o que não altera a possibilidade de faixa de trabalho até 4%, porém pode causar problemas no estabelecimento da variação intralaboratorial em condições de repetitividade.

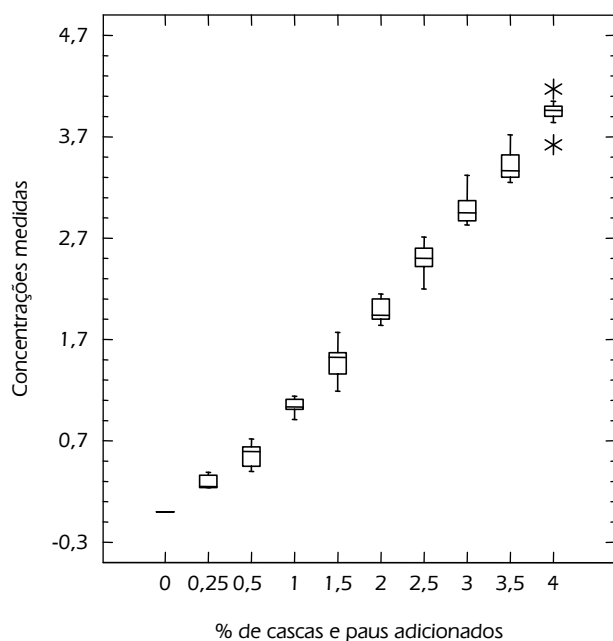


FIGURA 3. Desenho esquemático das concentrações medidas segundo concentração adicionada de cascas e paus.

Então, buscando uma estimativa mais realista para a variação intralaboratorial em condições de repetitividade, a concentração 4% foi isolada, e o modelo de delineamento anterior foi reajustado. A Tabela 5 traz os resultados do novo ajuste.

TABELA 5. Resultados do ajuste segundo modelo de delineamento para cascas e paus, excluindo-se limites de quantificação e origem.

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma quadrados	Quadrado médio	F
Cascas e paus	7	114,19	16,31	379,80 ^a
Erro	85	3,65	0,04	-
Total	92	117,84	-	-

^a: significativo; $p < 0,01$; e F: F de Snedecor.

Examinando o novo ajuste da Tabela 5, a variação aleatória da Tabela 2, $s^2 = 0,46$, passou por alterações intensas, de modo que o novo desvio padrão foi $s^2 = 0,20$.

Este novo modelo demonstrou comportamento melhor que o anterior e com esta modelagem os detalhes dos dados aberrantes (*outliers*) e da variância acentuada citados no item anterior foram revistos. O exame da Figura 3 apresentou ausência dos dados anteriormente classificados como possíveis valores aberrantes e não demonstrou desigualdade de precisões. Portanto, problemas de imprecisões não foram confirmados para a análise de cascas e paus no intervalo pesquisado.

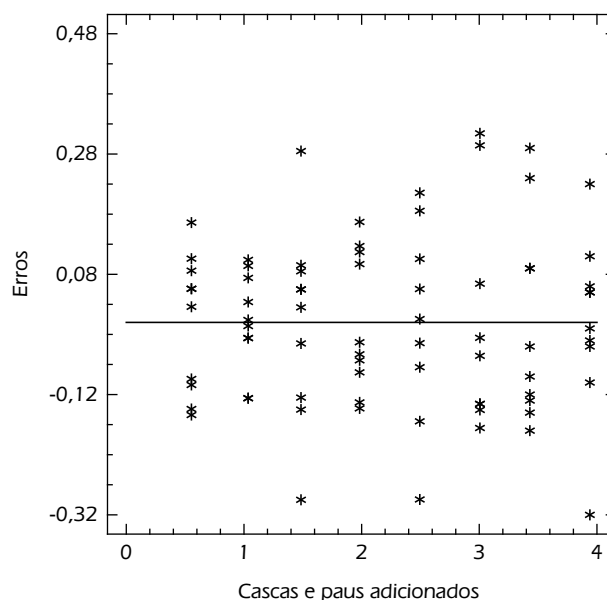


FIGURA 4. Erros de modelagem para medição de cascas e paus (%).

Deste modo, considerando-se o último modelo mais realista, admitiu-se esse novo desvio padrão $s^2 = 0,20$ como estimativa temporária da variação intralaboratorial. Adotando-se duplicatas na medição de um analito em um intervalo aproximadamente 95% de confiança, a expressão $\bar{X} \pm s / \sqrt{n}$, onde s é o desvio padrão e n as repetições, portanto $s / \sqrt{n} = 0,2 / \sqrt{2} = 0,14$.

TABELA 6. Intervalos de confiança a 95% para médias de duplicatas, segundo concentrações de cascas e paus adicionados e limites de precisão.

Concentração adicionada (%)	Amostras	Média amostral	Intervalo
0,50	10	0,55	$0,55 \pm 0,14$
1,00	23	1,05	$1,05 \pm 0,14$
1,50	10	1,48	$1,49 \pm 0,14$
2,00	10	1,98	$1,98 \pm 0,14$
2,50	10	2,62	$2,62 \pm 0,14$
3,00	10	2,92	$2,92 \pm 0,14$
3,50	10	3,43	$3,43 \pm 0,14$
4,00	10	3,94	$3,94 \pm 0,14$

Assim, o valor 0,14 é uma estimativa de incerteza temporária e diferenças entre duplicatas serão sempre inferiores a r^1 (limite da variação intralaboratorial em condições de repetitividade = 0,55).

Logo, obtendo-se um resultado médio de 0,60 advindo de duplicatas, este poderá ser escrito $0,60 \pm 0,14$, até que novos experimentos ou ensaios mais específicos alterem este tipo de desvio padrão. Uma confirmação ou correção deste valor poderá ser feita, por exemplo, por ensaios de precisão.

3.8 Falsos positivos e negativos

Na medição de cascas e paus no experimento todo não houve vício. Assim, do ponto de vista qualitativo/quantitativo, falsos negativos/positivos na medição no intervalo estudado não ocorreram. Ainda, na medição de cascas e paus na presença de soja, falsos negativos/positivos não foram encontrados.

No entanto, deve-se ressaltar que a medição realizada por ambos os métodos, por microscopia e por imagem, exigem, além do treinamento realizado, o reconhecimento/discriminação de cores. Deste modo, seria interessante que os analistas, antes do treinamento, realizassem testes de acuidade visual de cor, como o de Munsell - Fansworth ou similares, especialmente para outros contaminantes ainda não estudados.

Adicionalmente, a hipótese de que os parâmetros de cor de café são únicos, diferenciando-o de quaisquer possíveis contaminantes, deve ser observada com a devida cautela.

3.9 Adequação ao uso

Até este ponto do trabalho, do ponto de vista dos requisitos estabelecidos por norma, o método foi validado. No entanto, há um método tradicional e, também, um limite legal de concentração anteriormente mencionado, que devem ser considerados. Então, medições deveriam ser realizadas para os 2 métodos nas mesmas condições, o que implica em usar as mesmas amostras.

TABELA 7. Método microscopia x método imagem.

Faixa de concentração (%)	Imprecisão método ext. aquoso	Número de amostras	Imprecisão método imagem	Número de amostras	Teste de homogeneidade
1 a 2	0,2488	8	0,410909	30	1,65 +
2 a 3	0,0899	13	0,521868	50	5,80 ^a

^a: significativo < 1%; +: significativo < 10%; e ext.: extrato.

Na Tabela 7 apresentam-se as imprecisões de medição pelo método tradicional, de extrato aquoso e o de imagem, nas concentrações mencionadas. Verificou-se que a precisão do método por imagem foi significativamente inferior à do tradicional.

Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que foram usados modelos log-lineares na preparação dos acessórios de medição, porém a real relação entre a concentração do mensurando e a medição por imagem não é exponencial e, sim, exponencial negativa. Portanto tem assíntota horizontal e infinitos máximos.

O emprego de concentrações muito altas no desenvolvimento do modelo obriga a reta da fase exponencial a se inclinar cada vez mais e, no início do eixo, torna-se inferior aos valores que seriam esperados. Porém, a comparação das variações de medição na concentração, entre 1-2 e 2-3, pelos 2 métodos demonstrou apenas parte da realidade.

Uma vez que nos dois intervalos de concentração apresentados na Tabela 7 as diferenças de precisão foram tão grandes (60,5 e 580,5%) é possível que tal diferença seja considerável em um intervalo importante, que é 0,2 a 1%.

Deste modo, a técnica é válida segundo os requisitos, mas não mede com a mesma precisão na faixa de interesse para classificação do café para fim de requisito legal. Portanto, uma vez que o limite legal é de 1% de cascas e paus, a recomendação é que a relação medição por imagem X concentração seja refinada no método por imagem, incluindo reforço na faixa de 0,20 a 2,2%.

4. CONCLUSÕES

Nos requisitos apresentados, concluiu-se que:

- as medições para cascas e paus não foram significativamente influenciadas por interferentes como soja, logo o método foi seletivo para soja nas concentrações testadas;
- os limites de detecção e quantificação foram respectivamente 0,03 e 0,05%;
- a faixa de trabalho foi estabelecida como compreendida entre 0,05 e 4,00%;
- as análises de cascas e paus se mostraram livres de erro sistemático (vício) significativo;
- o limite de variabilidade intralaboratorial em condições de repetitividade $rs^r = 0,2$; e os resultados de duplicatas podem ser escritos $\bar{X} \pm 0,14$.

Pelos resultados obtidos, frente aos requisitos de validação:

- considerou-se o método validado para cascas e paus na faixa de trabalho determinada;
- frente ao limite legal, sugere-se refinamento da relação medição X concentração usando a faixa 0,2 a 2,2%, e testando o limite de detecção (0,03%) e quantificação (0,05%);

c) complementarmente, sugere-se que sejam realizadas medições por ambos os métodos em amostras preparadas para este fim, visando comparação mais realista que aquela obtida no item 3. 9.

REFERÊNCIAS

ASSAD, E. D. et al. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 211-216, 2002.

Associação Brasileira de Normas Técnicas, International Organization FOR Standardization, INTERNATIONAL ELETROTECHNICAL COMMISSION. **NBR / ISO / IEC 17025** : 2001 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 20 p.

BRASIL. Ministério da Saúde / SVS. Portaria n. 377 de 26 de abr. de 1999. **Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade as quais deve obedecer o café torrado em grão e o café torrado e moído**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 abr. 1999. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_portaria377_99_anvisa.pdf> Acesso em 11 set. 2005.

BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES; INTERNATIONAL ELETROTECHNICAL COMMISSION; INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION; INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY; INTERNATIONAL ORGANIZATION OF LEGAL METROLOGY. **International vocabulary of basic and general terms in metrology**. 2ª ed., Genève: ISO, 1993. 59 p.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. N. York: Wiley, 1981. 709 p.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, A laboratory guide to method validation and related topics**. EURACHEM: Teddington, 1998. 61 p.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D.A. **Nonparametric statistical methods**. New York: Wiley, 1973. 503 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGRE-008**: 2003 - Orientações

sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 36 p. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratorios/bpl.asp>> Acesso em 29 out. 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 3534-3**: 1993 - Statistics – vocabulary and symbols, Part 3: Design of experiments. Genève: ISO, 45 p.

REPORT OF A JOINT FAO/IAEA EXPERT CONSULTATION. **Validation of analytical methods for food control**. FAO Food and Nutrition Paper 68, Rome: FAO, 1998. 20 p. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/w8420e/w8420e00.pdf>> . Acesso em 11 mai. 2005.

KEMPTHORNE, O. **The design and analysis of experiments**. New York: Robert E. Krieger, 1979. 631 p.

MANUGISTICS. **Statgraphics reference manual**. Rockville: Manugistics, 1993. p. D14 - D23, M61 - M77, M107 - M110, S117 - S129.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES. **NATA Technical note 17**: 1998 - Format and contents of test methods and procedures for validation and verification of chemical tests methods. Sidney: NATA, 1998. 8 p.

SANO, E. E. et al. Quantifying adulteration in roast coffee powders by digital image processing. **Journal of Food Quality**, v. 26, n. 2, p. 123 -134, 2003.

SANO, E. E. et al. **Uso do Spring/INPE na identificação de fraudes em café torrado e moído**. In: IX Simpósio Latinoamericano de Percepcion Remota / SELPER 2000. Puerto Iguazu.: Selper, p. 211-216.

SAS. **SAS user's guide: statistics**. Cary: SAS, 1985. 956 p.

SCHEFFÉ, H. A statistical theory of calibration. **The Annals of Statistics**, v. 1, n. 1, p. 1-37, 1973.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University. 1980, 507 p.

THOMPSON, N.; STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the single laboratory validation of methods of analysis, IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.